

22.10.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 0 月 2 1 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 6 0 1 9 8  
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 6 0 1 9 8]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社ネーテック  
焼津水産化学工業株式会社

BEST AVAILABLE COPY

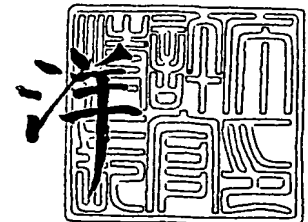
CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 9 7 8 9

【書類名】 特許願  
【整理番号】 JP4296NET  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 31/00  
A61K 9/08

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都品川区東五反田 2 丁目 4 番 6 号 - 2 0 5 号  
【氏名】 林 琢也

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都立川市一番町 6 丁目 2 4 番地 1 8 号  
【氏名】 石原 雅之

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区久本 3 丁目 1 2 番 2 0 号 - 7 0 2 号  
【氏名】 由良 洋文

【特許出願人】  
【識別番号】 596021735  
【氏名又は名称】 株式会社ネーテック

【代理人】  
【識別番号】 100109726  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 園田 吉隆

【選任した代理人】  
【識別番号】 100101199  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小林 義教

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 058621  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

糖鎖含有キトサン誘導体を含んでなることを特徴とする粘膜下膨隆液組成物。

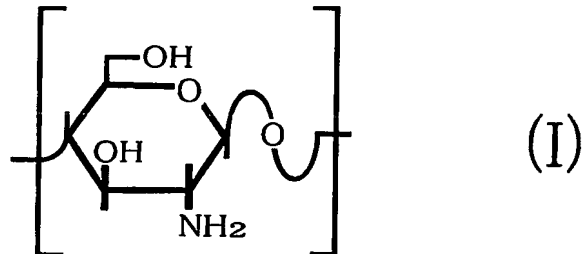
## 【請求項 2】

糖鎖含有キトサン誘導体を 0.5～8.0 重量% 含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

糖鎖含有キトサン誘導体が、下記式 (I) :

## 【化 1】

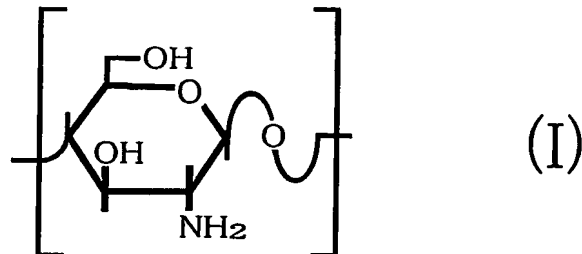


で表される単位を含んでなるキチン・キトサン類のグルコサミン単位の 2 位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入してなる高分子であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

糖鎖含有キトサン誘導体が、下記式 (I) :

## 【化 2】



で表される単位を含んでなるキチン・キトサン類のグルコサミン単位の 2 位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入し、他の少なくとも一部に光反応性基を導入してなる高分子であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

糖鎖が、グルコース、フルクトース、ガラクトース、フコース、マンノース、アラビノース、キシロース、エリトロース、ヘプツロース、ヘキシロースを含むペンタオース又はヘキサオース；グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、ガラクサミンを含むアミノ糖類；ウロン酸類及びデオキシ糖類を含む糖誘導体；これらの単糖類を組み合わせた糖鎖からなる、マルトース、イソマルトース、ラクトース、メリビオース、マルトトリオースを含む二糖類又は三糖類及びオリゴ糖類から選択されることを特徴とする、請求項 3 または 4 に記載の組成物。

## 【請求項 6】


光反応性基が、カルボニルアジド基、スルホニルアジド基、芳香族アジド基、及びホルミルスチリル基から選択されることを特徴とする、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

糖鎖含有キトサン誘導体が、さらに両親媒性基を有することを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物を粘膜下層に局注する手段を具備すること



を特徴とする E M R 用内視鏡システム。

【請求項 9】

局注された組成物に光照射する手段を更に具備することを特徴とする請求項 8 に記載の E M R 用内視鏡システム。

【書類名】明細書

【発明の名称】糖鎖含有キトサン誘導体を含むEMR用粘膜膨隆液組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖鎖含有キトサン誘導体を含む組成物に関する。特に、EMRにおいて粘膜下に局注して病変部を含む粘膜を膨隆させるのに最適な組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

昨今の内視鏡技術の発達により、病変部の内視鏡的切除術は、食道、胃又は腸を含む消化管のポリープや早期癌（リンパ節転移が無いと考えられている表層癌）等への適応が確立されてきている。内視鏡的粘膜切除術（EMR=Endoscopic Mucosal Resection）は、低侵襲の手術法として、外科的開腹手術が困難な高齢者や重篤な合併症を有する患者等に主に適応されてきたが、QOLの面から一般患者への適応としても第一の選択肢となっている。

【0003】

EMRは一般に、病変部及びその辺縁部に適当なマーキングを付し、マーキングした病変部を含む粘膜下層に高張食塩水等を注入して病変部を隆起させ、切除すべき部分を把持しながらスネアリングし、高周波電流によって病変部を含む組織を切開し、切開した組織を回収して組織検査に供するという手技を含んでいる（非特許文献1）。

【0004】

EMRにおいて粘膜切開を安全に行うためには病変部と固有筋層とを引き離すことが必要である。そのために、粘膜下層に高張食塩水等の液体（「粘膜下膨隆液」と称する）が局注される。病変部を含む粘膜の隆起が十分でないと、目的とする部位でスネアリング等による切開をすることが困難になり、病変部を確実に切除できなかったり、粘膜下に存在する固有筋層まで切開して穿孔を生じることもある。よって、望まれる粘膜隆起レベルが切除完了まで維持されるような粘膜下膨隆液が必要とされている。

【0005】

さらに、穿孔とともにEMRにおいて発生しがちな他の合併症は出血である。そこで、高張食塩水等に血管収縮作用を有するエピネフリンを添加することによって出血量を抑制することが行われていた（非特許文献2）。しかしながら、エピネフリンの添加によって出血量を抑制しても煩雑な止血操作を回避するするには至らない。加えて、粘膜下膨隆液として食塩水等の低粘度液体を使用したのでは、局注針の進入部や切開の一刀目で生じた間隙等から粘膜下膨隆液が漏れ出し、注入時の膨隆レベルが維持できないという問題があった。

【0006】

近年、上記の問題を解決するため、粘膜下膨隆液にグルコースやヒアルロン酸ナトリウム等を添加して膨隆を維持する試みが行われ、ヒアルロン酸を使用した場合に、ブタ食道で行った動物実験において、膨隆継続時間を平均約23分程度まで延長できたことが報告されている（非特許文献3）。ところが、EMRが完了するまでに1時間以上、ときには数時間を要する場合もあり、よって、膨隆継続時間をさらに延長することのできる粘膜下膨隆液が要望されている。また、ヒアルロン酸の添加によって膨隆継続時間を或る程度延長できたとしても、出血予防のためにはエピネフリンをさらに添加する必要があった。

【0007】

【非特許文献1】林琢也等、「臨床と研究」、第72巻、第5号、第52-55頁、1995年

【非特許文献2】「Endoscopic Surgery 切開・剥離EMR」、小山恒男著、日本メディカルセンター発行、第30-31頁、2003年

【非特許文献3】Massimo Conio等, Gastrointestinal Endoscopy, Vol. 56, p513-516 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

よって本発明における課題は、さらに長時間にわたる粘膜隆起を確保することができ、穿孔を防止してEMRの信頼性を向上させることのできる粘膜下膨隆液を提供することにある。さらに本発明は、出血を有効に防止できる粘膜膨隆液を提供することにもある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、糖鎖含有キトサン誘導体を含有する組成物をEMRにおける粘膜下膨隆液として用いた場合、粘膜の膨隆を極めて長期にわたって維持できるとともに、出血の防止抑制効果も得られることを見出した。

即ち本発明は、糖鎖含有キトサン誘導体を含有することを特徴とするEMR用粘膜膨隆液を提供する。

## 【発明の効果】

## 【0010】

本発明の粘膜下膨隆液によれば、糖鎖含有キトサン誘導体に基づく粘性により、粘膜を長時間（24時間以上）に渡って隆起させておくことが可能になる。しかも、残ったキトサン誘導体が出血巣を取り囲むため、出血量を格段に少なくすることができる。その結果、穿孔及び出血というEMR治療における主要な2つの問題を同時に解決することができる。

## 【0011】

本発明の粘膜下膨隆液に配合される糖鎖含有キトサン誘導体は、キトサン骨格にラクトース等の糖鎖を導入したものであり、特に中性pHでの水溶性を向上させたキトサン誘導体である。光架橋性を付加したキトサン誘導体は、粘膜下層に注入した後に紫外線等の光を照射することにより不溶性のハイドロゲルを形成し、形状保持性（粘膜膨隆維持能）がさらに向上する。

## 【0012】

粘膜膨隆液は、通常、23G程度のステンレス針を通して粘膜下層に局注される。従って、容易に針を通して注入可能でなければならない。また、注入された膨隆液は、血流等による流散に抗するのに十分な程度の粘性を有しているのが好ましい。さらに、EMRにより粘膜を切除した後に粘膜下層に保持されるのが好ましい。これらの条件に鑑みて、本発明の組成物は、糖鎖キトサン誘導体を0.5～8.0重量%、好ましくは1.0～5.0重量%、より好ましくは2.0～3.0重量%、最も好ましくは約2.5重量%含有するものとした。このような割合で調製された膨隆液は、例えば、市販されている回転粘度計（例えば、B型粘度計、TOKIMEC INC. (Tokyo Japan)）で測定した場合に約300cps（センチポアズ（mPa・s））未満、さらには約200cps未満、さらには約100cps未満の低粘度となる。

## 【0013】

また、光架橋性を付与したキトサン誘導体を使用する場合には、粘膜下層に注入後に光照射してハイドロゲルを形成させるのが好ましい。光による架橋条件は、使用する光架橋性キトサン誘導体に導入した光反応性基の種類や置換度、組成物に含有されるキトサン誘導体の量、注入する組成物の量及び望ましい硬さ等に応じて変化する。架橋反応度は特に限られないが、一般に、架橋反応度が高いほど形成されるハイドロゲルが硬くなる傾向がある。

このように、局注される膨隆液に物理的引き金によって不溶化する性質を付与し、注入後に不溶化させて組織内留置性を高めるという概念は、これまでに提案されておらず、本発明によって初めて達成されたものである。

## 【0014】

本発明の組成物は、光照射しない状態でも出血を抑制する効果が確認された。これは、組成物の粘性及びキトサンの特性に基づくものと考えられる。さらに、光照射によって形成されたハイドロゲルは格段に優れた止血効果を示した。例えば、ヘパリン化によって通常は止血が困難な状況下でも10分以内に出血が停止した。即ち、本発明の組成物は、エ

ビネフリン等の止血剤を使用しなくてもEMRにおける出血を抑制、防止する効果に優れている。

【発明を実施するための最良の形態】

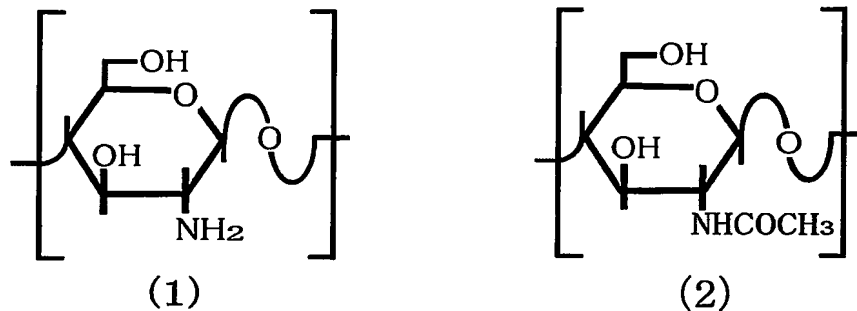
【0015】

本発明で好ましく使用される糖鎖含有キトサン誘導体としては、国際特許出願W000/27889号パンフレットに記載されたものが挙げられる。具体的には、一般にキチン・キトサン類と呼ばれている高分子骨格に糖鎖と任意に光反応性基を導入した構造を有しており、中でも、少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位<sup>2</sup>の2位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入し、好ましくは他の少なくとも一部に光反応性基を導入してなるものである。

【0016】

通常、キチン・キトサン類は、カニ殻由来のキチン質（ポリ-N-アセチルグルコサミン）をアルカリ処理することによって得られる脱アセチル化した酸可溶性画分であって、一般に下記式（1）、（2）で示される構成単位を有するものである。

【化1】



これらキチン・キトサン類のうち脱アセチル化度の低いもの（通常40%未満のもの）を「キチン」、そして脱アセチル化度の高いもの（通常40%以上のもの）を「キトサン」と呼ぶこともあるが、以下、本明細書では、少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を総称して「キトサン」という。なお、本発明におけるキトサンは天然由来のものに限らず、化学的または遺伝子工学的に合成された類似構造を有する化学修飾糖鎖であってもよい。

【0017】

ここで、「脱アセチル化度」とは、キトサン（あるいは、ポリ-N-アセチルグルコサミン）を構成する糖単位の2位のアセチルアミノ基のうち脱アセチル化によって遊離アミノ基に変換されている基の割合である。本明細書では、脱アセチル化度は、「健康食品規格規準集（その4）」財団法人日本健康・栄養食品協会（1996年）第55頁に記載の「コロイド滴定法」によって定量した。

【0018】

本発明で使用される糖鎖含有キトサン誘導体は、このキトサン骨格をさらに化学的に修飾することにより機能化したものであり、原料として使用されるキトサンとしては、脱アセチル化度が少なくとも40%、特に60～100%、さらに特に65～95%の範囲にあるものが好適である。なお、脱アセチル化度が100%のキトサンは、上記式（1）の構成単位のみからなり、式（2）の構成単位は含まない。

【0019】

また、該キトサンの分子量には特に制限はなく、最終的なキトサン誘導体の使用目的に応じて広い範囲で変えることができるが、一般には、数平均分子量が5,000～2,000,000、好ましくは10,000～から1,800,000、より好ましくは40,000～1,500,000の範囲のものが適している。

【0020】

キトサン骨格に導入される還元性末端を有する糖鎖としては、アルドース類、ケトース類に由来するものが包含され、中でも、構成糖単位の数が20個以下、特に1~7個のものが好適に使用される。具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、フコース、マンノース、アラビノース、キシロース、エリトロース、ヘプツロース、ヘキシロース等のペンタオースやヘキサオース；グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、ガラクサミン等のアミノ糖類；ウロン酸類やデオキシ糖類等の糖誘導体；これらの単糖類を組み合わせた糖鎖からなる、マルトース、イソマルトース、ラクトース、メリビオース、マルトトリオース等の二もしくは三糖類；及び各種オリゴ糖類等が挙げられるが、中でもマルトース、ラクトース、メリビオースなどの中性二糖類が好適である。

#### 【0021】

上記糖鎖に換えて、ポリエーテル、多価アルコールなどの有機化合物をキトサンに誘導することもできるが、生体適合性などの面で天然の糖鎖を利用するのが好ましい。

キトサンの前記式(1)のグルコサミン単位における2位アミノ基への糖鎖の導入は、それ自体既知の方法を用いて行うことができる。例えば、糖類の還元性末端をカルボキシル化した後、グルコサミン単位の2位アミノ基にアミド結合を介して結合させる方法（例えば、特開平10-120705号公報参照）や、糖類の還元性末端をアルデヒド化またはカルボニル化した後、それをグルコサミン単位の2位アミノ基に、シッフ塩基を経由する還元アルキル化法により結合させる方法（例えば、キチン・キトサン研究会編「キチン・キトサンの応用」53-56頁、1990年2月20日、技法堂出版発行参照）などが含まれる。

#### 【0022】

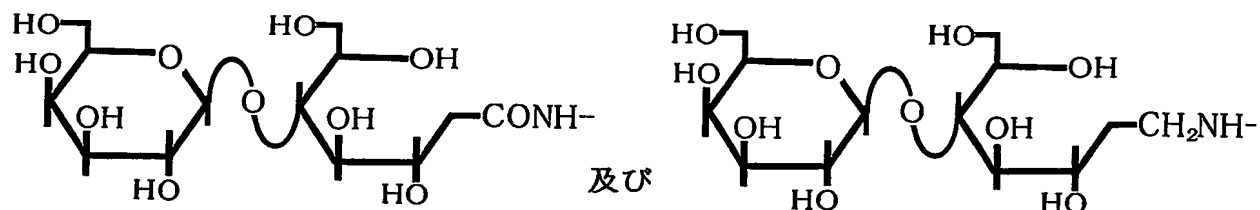
本発明でキトサン骨格に導入される糖類は1種のみに限定されるものではなく、2種以上を組み合わせて導入することもできる。

本発明の糖鎖含有キトサン誘導体を構成する糖側鎖の具体例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

#### 【0023】

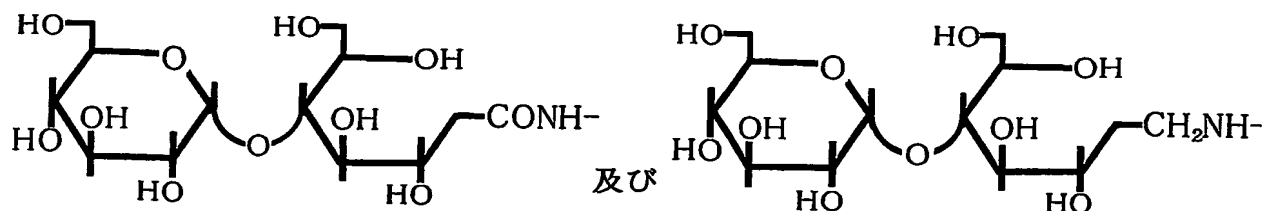
(i) ラクトースから誘導される糖鎖：

##### 【化2】



(ii) マルトースから誘導される糖鎖：

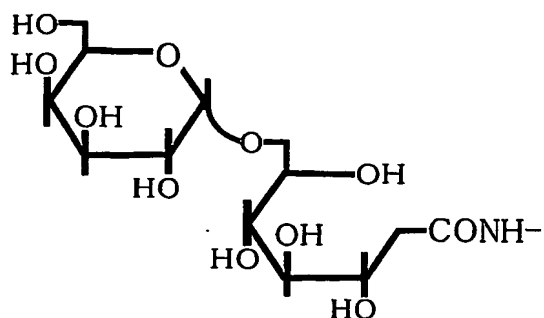
##### 【化3】



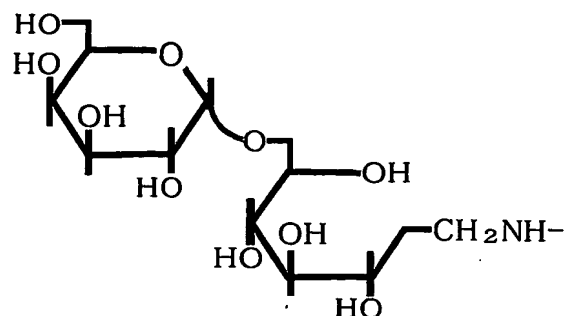
(iii) メリビオースから誘導される糖鎖：



【化4】

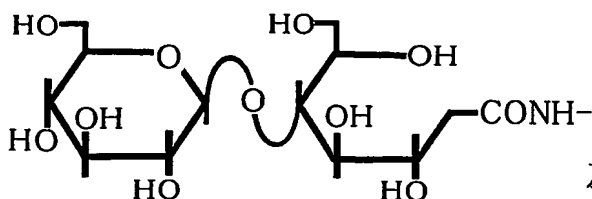


及び

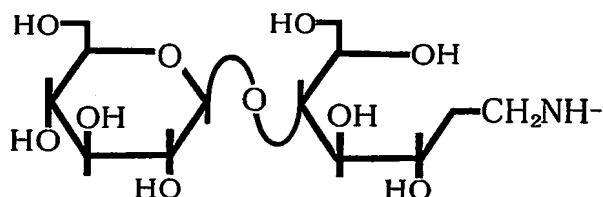


(iv) セロビオースから誘導される糖鎖:

【化5】



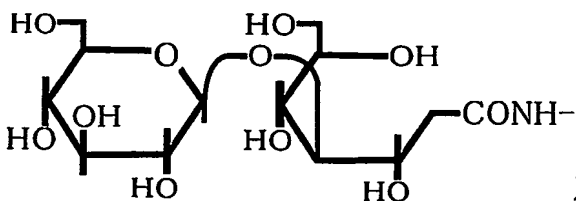
及び



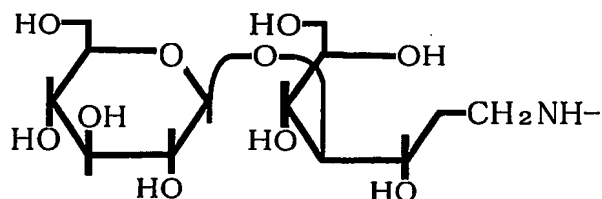
【0024】

(v) ラミナリビオースから誘導される糖鎖:

【化6】

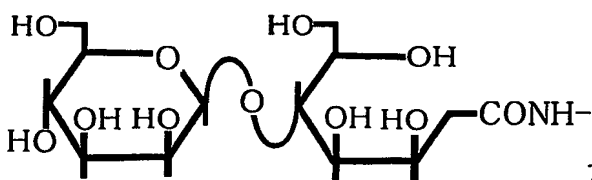


及び

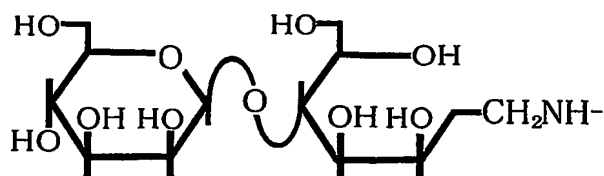


(vi) マンノビオースから誘導される糖鎖:

【化7】

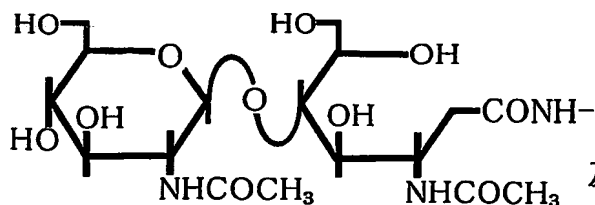


及び

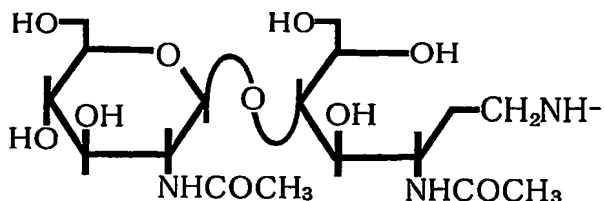


(vii) N-アセチルキトビオースから誘導される糖鎖:

【化8】



及び



【0025】

上記(i)~(vii)の糖側鎖のうち、左側に記載したものは糖のカルボキシル基とキトサンの2位アミノ基との縮合によって導入される残基を表し、右側に記載したものはシッフ塩基を介して結合させた残基を表す。

このようにして、キトサンのグルコサミン単位の2位アミノ基を糖類で置換することにより、キトサンの酸依存的溶解性が緩和され、中性領域での可溶化が達成される。

## 【0026】

キトサンのグルコサミン単位における2位アミノ基の糖側鎖による置換度は、最終的なキトサン誘導体に望まれる物性などに応じて変えることができるが、置換度は、一般的には0.1～80%、特に0.5～60%、さらに特に1～40%の範囲内にあるのが好適である。ここで、糖側鎖の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の2位のアミノ基のうち糖側鎖で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の2位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する置換アミノ基の割合として示される。本明細書では、糖側鎖の置換度は、硫酸中で糖鎖がフェノールと反応することに基づく特徴的な発色を490nmの吸光度で検知する「フェノールー硫酸法」によって測定される(J.E.Hodge, B.T.Hofreiter, "Methods in Carbohydrate Chemistry", ed. by R.L.Whistler, M.L.Wolfro m, vol.1, p388, Academic Press, New York(1962)参照)。

## 【0027】

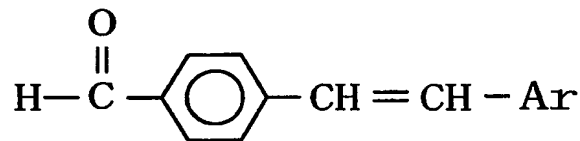
本発明で使用される糖鎖含有キトサン誘導体としては、キトサンを構成する前記式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基の他の少なくとも一部に光反応性基を導入したものが好ましく、それにより、光照射による自己架橋性が付与される。

キトサン骨格の化学修飾に使用される光反応性基は、紫外線、特に約200～380nmの近紫外領域を含む紫外線の照射によって該光反応性基同志で及び/又はキトサン中に存在するアミノ基あるいは水酸基等と反応して架橋結合を形成するような基を含む。例えば、ベンゾフェノン類、ケイ皮酸類、アジド類、ジオレフィン類、ビスアントラセンのような環状不飽和化合物等から誘導されるものが挙げられ、中でも、カルボニルアジド基、スルホニルアジド基、芳香族アジド基を有するものが好適である。

## 【0028】

また、光反応性基は、約400～500nm程度の可視光の照射で反応する置換基であってもよい。このような可視光反応性基としては、例えば、下記式で表されるような、Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition, Vol.20, 1419-1432 (1982)に記載されたホルミルスチリル化合物等が挙げられる。

## 【化9】



(上記式中、Arは、ピリジン、アルキルピリジニウム塩、キノリン、アルキルキノリニウム塩等の複素環を表す。)

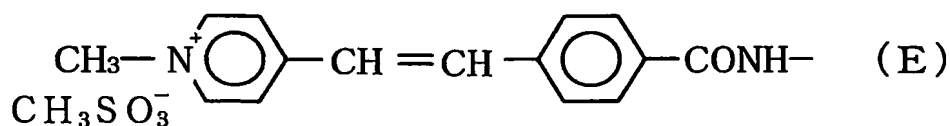
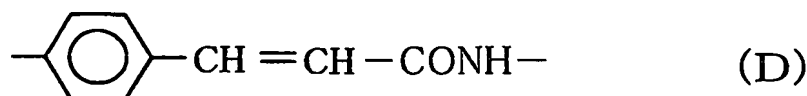
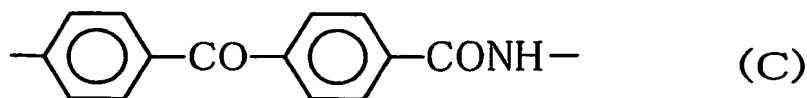
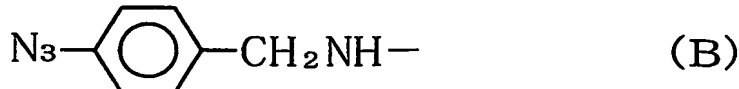
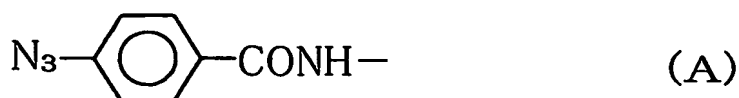
## 【0029】

かかる光反応性基の導入は、それ自体既知の方法により行うことができ、例えば、カルボキシル基を有するアジド化合物を縮合剤の存在下に該2位のアミノ基に結合させる方法(特開平10-120705号公報参照)；酸クロリド基、アルデヒド基、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル基又はエポキシ基を介してアジド化合物を該2位のアミノ基と反応させる方法(キチン・キトサン研究会編「キチン、キトサンの応用」第45～65頁、1990年2月20日、技報堂出版発行、参照)等の方法により行うことができる。上記のホルミルスチリル化合物のホルミル基をキトサンのアミノ基とカップリングさせることによっても好適に導入できる。

## 【0030】

糖鎖含有キトサン誘導体に導入される光反応性基の具体例としては、例えば、紫外線の場合は、下記式(A)から(D)で表されるものが挙げられる。式(A)の基はp-アジド安息香酸から誘導されるものであり、式(B)の基はp-アジドベンズアルデヒドから誘導されるものであり、式(C)の基はp-ベンゾイル安息香酸から誘導されるものであり、式(D)の基はケイ皮酸から誘導されるものであり、そして式(E)は1-メチル-4-[2-(ホルミルフェニル)エテニル]ピリジニウムから誘導されるものである。

## 【化10】



## 【0031】

これらの光反応性基の導入の程度は、最終的なキトサン誘導体に望まれる架橋反応に基づくゲル化（不溶化）の程度等に応じて変えることができるが、光反応性基の置換度を0.1%～80%、特に0.5～50%、さらに特に1～30%の範囲内にすることが望ましい。ここで、光反応性基の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の2位のアミノ基が光反応性感応基で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の2位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する置換アミノ基の割合である。本明細書では、光反応性基、例えばアジド基の置換度は、4-アジド安息香酸の270nmにおける特性吸収から得られる検量線に基づいて決定した。

## 【0032】

本発明のキトサン誘導体における糖側鎖と光反応性基の合計の置換度は、特に制限されるものではなく、広い範囲に渡って変えることができるが、一般には0.2～80%、好ましくは1.5～65%、さらに好ましくは3～50%の範囲内とすることができる。

## 【0033】

また、本発明で使用される糖鎖含有キトサン誘導体では、キトサン骨格を構成する前記式(1)の糖単位の2位のアミノ基や、式(1)又は(2)の糖単位の3位あるいは6位の水酸基の少なくとも一部に、さらに両親媒性基を導入してもよく、それにより架橋後のハイドロゲルに飛躍的に向上した含水性を付加することができる。この両親媒性基は、疎水性基を具備する疎水ブロックと親水基を具備する親水ブロックとを有する基であり、一般に界面活性剤機能を有する場合が多い。中でも、疎水ブロック(X)と親水ブロック(Y)の分子量の割合が、X:Y=1:5～5:1のものが好適に用いられ、解離性のイオン基を持たない非イオン性の基がより好適に使用できる。特に、疎水性のアルキルブロックと親水性のポリオキシアルキレンブロックから構成される分子量が少なくとも90以上、より好ましくは500～10,000のポリオキシアルキレンアルキルエーテルが好ましい。疎水ブロックを持たないポリエーテル類も使用できるが、疎水ブロックと親水ブロックの両方を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテルが含水性向上の点から好ましい。

## 【0034】

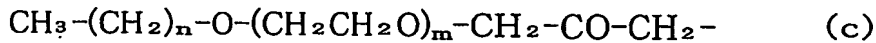
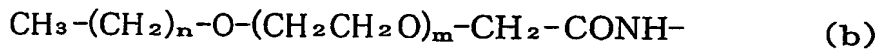
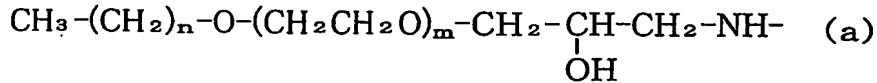
かかる両親媒性基のキトサンへの導入は、例えば、両親媒性基の親水ブロック又は疎水ブロックのいずれか一方の末端に、アミノ基と反応して共有結合を形成しうる基、例えば、アルデヒド基やエポキシ基などを持つ化合物を導入した後、キトサンのグルコサミンの2位アミノ基と反応させる方法や、カルボキシル基を有するポリオキシアルキレンアルキ

ルエーテル誘導体とキトサンとを縮合剤の存在下で反応させる方法、あるいは酸クロリド基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体をキトサンの水酸基やアミノ基と反応させる方法などを用いて行うことができる。

#### 【0035】

例えば、末端にエポキシ基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基あるいは末端にアルデヒド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンのアミノ基に導入した場合、キトサン骨格に結合した側鎖は下記式 (a) あるいは (b) で表される。また、末端に酸クロリド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンの3位または6位の水酸基に結合させた場合、キトサン骨格に結合した側鎖は、下記式 (c) で表される。ただし、下記式 (a) ~ (c) における n 及び m は 1 以上の繰返し単位数である。

#### 【化11】



本発明のキトサン誘導体における両親媒性基の導入の程度は、特に制限されるものではないが、導入後のキトサン誘導体の重量変化に基づいて、通常 5 ~ 70 %、好ましくは 15 ~ 55 % の範囲内とすることができる。

#### 【0036】

本発明に係る膨隆液組成物は、上記のような糖鎖含有キトサン誘導体を水等の溶媒に溶解させることにより液体製剤として調製することができる。溶解させる糖鎖含有キトサン誘導体の濃度は上記の通りである。本発明で好ましく使用される糖鎖含有キトサン誘導体にあつては、糖類を導入することにより中性領域での水溶性に優れており、生理的緩衝液などで製剤化することができ、例えばタンパク質等の酸やアルカリで変性する可能性のある薬物の活性を失うことなく添加することも可能になる。

例えば、本発明の組成物はそれ自体に十分な止血作用があるが、エピネフリン等の止血作用を持つ他の薬剤を配合して出血防止能を更に向上させてもよし、抗ガン剤を添加して治癒促進（あるいは再発防止）効果を付与してもよい。

#### 【0037】

また、光反応性基を導入した糖鎖含有キトサン誘導体を用いる場合には、製造した膨隆液を粘膜下層に注入した後に光照射することによって即時に不溶性ゲルを形成し、粘膜隆起維持を従来からは予測できないほど格段に長期化することができる。また、光架橋により形成されたハイドロゲルは、配合した薬剤等を徐放するマトリクスの役割も果たす。

#### 【0038】

光による架橋条件は、使用する光架橋性キトサン誘導体に導入した光反応性基の種類や置換度、組成物に溶解されるキトサン誘導体の量、注入される組成物の量、及び望ましい硬度等に応じて変化しうる。通常は、約 2.5 mg/ml 程度の光架橋性キトサン誘導体を含有する組成物を 30 μl 程度使用する場合、約 2 cm 程度離間した光源からの光を、約 0.01 ~ 100 秒、好ましくは約 0.02 ~ 60 秒、さらに好ましくは 0.1 ~ 30 秒、もっとも好ましくは数秒程度照射するのが好ましく、これにより十分な硬度を持ったゲルが形成される。

#### 【0039】

光照射は、本発明の膨隆液組成物を注入した後、病変部を切開する前に実施してもよいし、病変部を切開した後に露出された組成物に照射してゲル化させてもよい。前者の場合、膨隆液を注入する針と一体化した又は別個の光ファイバーを通して光照射して組成物を

ゲル化させる。後者の場合、例えば、内視鏡のチャンネルを介して挿入した光ファイバーを通して露出した組成物に光照射する。

#### 【0040】

さらに、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル等の両親媒性基を導入した場合には、光架橋したハイドロゲルの吸水性が格段に向上する（自重の100倍程度となる）ため、傷口から流出した血液を吸収して止血及び治癒を早めることもできる。

#### 【0041】

以下、本発明を具体例によりさらに詳細に説明するが、これらの具体例は本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0042】

##### （実施例1）

光架橋性糖鎖含有キトサン誘導体の調製

光架橋性糖鎖含有キトサン誘導体（「Az-CH-LA」とする）は、WO00/27889に記載したようにして調製した。具体的には、およそ300～600kDaの分子量、80%の脱アセチル化度を有するキトサン（焼津水産化学工業（株）製）を原料として使用した。アジド（p-アジド安息香酸）及びラクトース（ラクトビオン酸）を、アミノ基との縮合反応を介して上記キトサン分子に導入した。得られたキトサン誘導体のアミノ基の2.5%及び2%が各々p-アジド安息香酸及びラクトビオン酸で置換された。ラクトースの導入により得られた誘導体は中性pHで水溶性であった。

#### 【0043】

得られたAz-CH-LAの水溶液（20～30mg/ml）を調製し、2cm離間したランプで約10秒UV照射（UV-照射システム：ガイドファイバーユニット（SF-101BQ）及び250Wランプ（240-380nm）を具備するSpot Cure ML-251C/A；ウシオ電機製）することにより、光架橋反応を介して不溶性のハイドロゲルが形成された。

#### 【0044】

##### （実施例2）

粘膜下層の厚みの測定：

実験には、Sprague-Dawleyラット（15-16週齢、全て雄であり、平均体重325±15g；SLC Japan）を使用した。終夜絶食させた後、ラットをペントバルビタール（25mg/kg）で麻酔し、開腹術後に前壁胃造瘻術により腺胃粘膜を露出させた。2.5%のAz-CH-LA水溶液（0.3ml）又は食塩水（0.3ml）を、後壁粘膜下層に、25Gのステンレススチール針を通して注入した。注入後、粘膜表面を30分間観察し、各群から5匹ずつのラットを麻酔薬の過剰投与によって犠牲にした。他のラットでは、処理の30分後、皮下に10mlの生理食塩水を注入して乾燥を防ぎ、胃及び腹部を閉じた。これらのラットは6時間後（各群についてn=5）及び24時間後（各群についてn=5）に犠牲にした。次いで、組織を取り出し、10%ホルマリンで2日間固定した。次に、粘膜下層の厚みを、固定した試料の断面の顕微鏡観察により測定した。また、試料をパラフィンに包埋し、切り出し、ヘマトキシリン-エオシン（HE）試薬で染色した。

#### 【0045】

Az-CH-LA溶液及び食塩水を注入した直後、粘膜表面は同程度に隆起された。しかし、30分後には、隆起された領域は、Az-CH-LA注入群では注入直後と同様の急勾配な起伏が見られたが、食塩水注入群では30分以内に起伏が顕著に収縮した（図2）。所定時間経過後における粘膜下層の厚みを下記の表1に示す。表1における結果は、平均値±S.E.で示し、データは、有意性レベルをP<0.05としたMann-Whitney U-testを用いて分析した。

#### 【0046】

【表 1】

	30分後	6時間後	24時間後
Az-CH-LA 注入群	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1
食塩水注入群	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.3

数値は平均±S.E.(mm)である (各群について n=5)

## 【0047】

24時間以内の如何なる時点でも、Az-CH-LA注入した粘膜下層は食塩水注入したものより有意に厚みが大きかった。食塩水注入群では30分後以降の厚みが変化していないことから、30分以内に全ての食塩水が流出してしまったことが示唆される。組織学的試験により、エオシンで均一に染色されたAz-CH-LAが粘膜下組織に保持されていることが明らかになった。

## 【0048】

## (実施例3)

出血量の測定:

実施例2と同じ方法を用いて2.5%のAz-CH-LA水溶液又は食塩水を注入する前に、ヘパリン(300単位)を静脈注射した。粘膜の隆起された領域の頂点周辺の粘膜(直径5-6mm)を外科用メスを用いて切開した。Az-CH-LA群では、切開した傷に上記のUV-照射システムを用いて30秒間UV光を即座に照射した(各群についてn=10)。出血量測定は5分ごとに4回(20分間)行い、次いで動物を麻酔薬の過剰投与により犠牲にした。組織学的試験のために胃を切除した。取り出した組織は、10%ホルマリンで2日間固定し、パラフィンに包埋し、切り出し、ヘマトキシリン-エオシン(H.E)試薬で染色した。

## 【0049】

Az-CH-LA注入群では、切開した粘膜辺縁部又は粘膜辺縁部とAz-CH-LAとの間隙から出血が見られた(照射前)。しかし、UV照射の5~10分後に出血は完全に停止し、形成されたゲルが開口部を閉塞する糊として作用した。食塩水注入群では、切開後20分間経過しても出血が続いていた。

## 【0050】

粘膜切開後の最初の5分間における血液損失は、Az-CH-LA注入群では63.1 ± 14.2 mgであったのに対し、食塩水注入群では92.2.9 ± 143.6 mgであった(p<0.001)(図3)。累積容量は、Az-CH-LA注入群では10分間で93.2 ± 10.5 mg、15分間で106.4 ± 15.2 mg、20分間で113.0 ± 15.5 mgであった。食塩水注入群では各々126.8.0 ± 105.5 mg、153.7.2 ± 125.4 mg、168.2.3 ± 95.2 mgであった。これらの値(血液損失)を時間に対して図3にプロットした。Az-CH-LA群での血液損失は、食塩水処理群より有意に少なかった。試料の組織学的観察により、Az-CH-LA注入群では、出血巣がキトサンハイドロゲルにより完全に囲まれていることが明らかになった。

## 【0051】

## (実施例4)

ヒアルロン酸ナトリウムを配合した膨隆液を用いて、実施例2及び3と同様の測定を行った。結果を、実施例2及び3の結果と合わせて図4及び5に示す。図4に示すように、ヒアルロン酸含有膨隆液を用いた場合(b)でも、注入30分後で既に粘膜隆起の縮小が見られるが、本発明の膨隆液を使用した場合(c)には、24時間後であっても顕著な隆起形状が保たれていた。さらに、本発明の膨隆液を使用した場合には、格段に優れた出血抑制効果が得られた(図5)。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0052】

本発明の粘膜下層膨隆液組成物に使用される糖鎖含有キトサン誘導体、及びそれを光架橋させて得られるハイドロゲルは、ヒト皮膚繊維芽細胞、ヒト上皮細胞、及びヒト平滑筋

細胞の培養実験において、いかなる細胞毒性も示さないことが確認された。さらに、突然変異誘発及び細胞毒性を含む生物に対する毒性試験においても、誘導体及びハイドロゲルの安全性が示された。よって、本発明の組成物は、特に E M R で使用される粘膜下層膨隆液として使用するのに最適である。

また、本発明の膨隆液は、内視鏡的手術に限らず、組織表層の癌細胞を切除したり止血するなどの一般の外科的処理においても使用可能であることはいうまでもない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 3 】

【図 1】 粘膜下膨隆液を局注した粘膜周辺組織の断面を示す模式図である。

【図 2】 糖鎖含有キトサン誘導体水溶液 (a) 及び食塩水 (b) を粘膜下組織に局注した 3 0 分後の粘膜周辺組織の断面を示す顕微鏡写真である。

【図 3】 糖鎖含有キトサン誘導体及び食塩水を粘膜下層に局注し、粘膜を切開した後の累積出血量 (血液損失) の時間変化を示すグラフである。

【図 4】 食塩水 (a) 及びヒアルロン酸水溶液 (b) の局注 3 0 分後、及び糖鎖含有キトサン誘導体水溶液 (c) の局注及び光照射後 2 4 時間における粘膜周辺組織の断面を示す顕微鏡写真である。

【図 5】 食塩水 (a)、ヒアルロン酸水溶液 (b)、糖鎖含有キトサン誘導体水溶液 (光架橋無し) (c)、及び糖鎖含有キトサン誘導体水溶液 (光架橋有り) (d) を局注後、粘膜を切開してからの出血量の変化を示すグラフである。

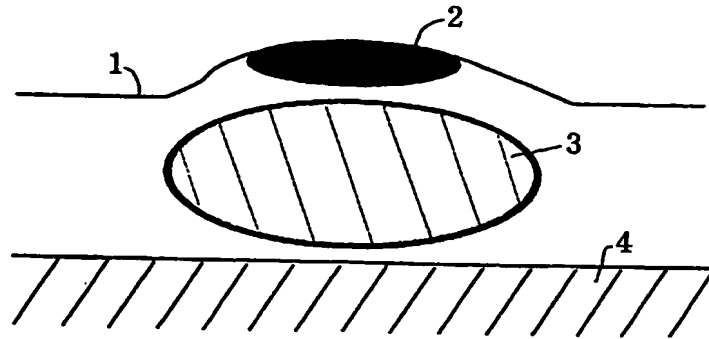
【符号の説明】

【 0 0 5 4 】

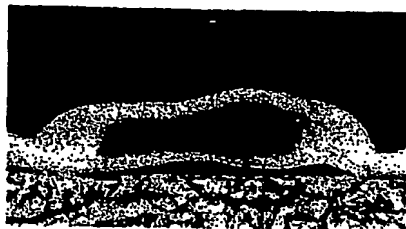
1 : 粘膜、 2 : 病変部、 3 : 粘膜下層膨隆液、 4 : 固有筋層

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

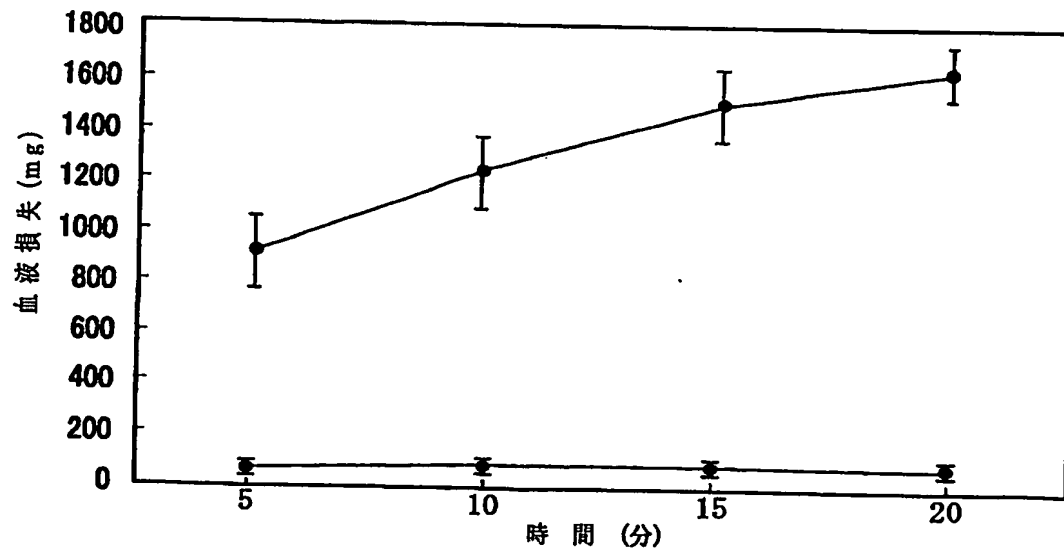


(a) 糖鎖含有キトサン誘導体



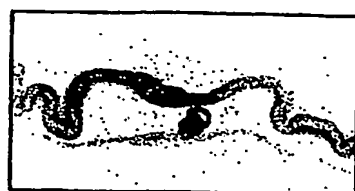
(b) 食塩水

【図 3】

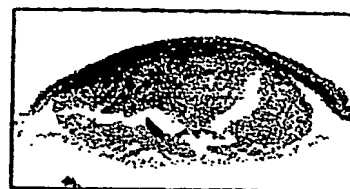




【図 4】



(a) 食塩水

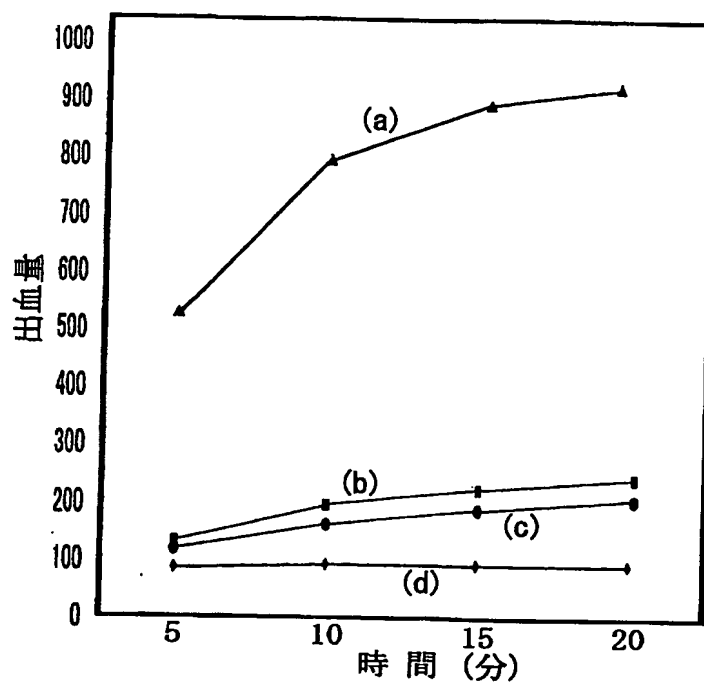


(c) 糖鎖含有キトサン誘導体



(b) ヒアルロン酸

【図 5】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 長時間にわたる粘膜隆起を確保することができ、穿孔を防止してEMRの信頼性を向上させ、さらに出血を有効に防止できる粘膜膨隆液を提供する。

**【解決手段】** 糖鎖含有キトサン誘導体を含むことを特徴とするEMR用粘膜膨隆液。この組成物をEMRにおける粘膜下膨隆液として用いた場合、粘膜の膨隆を極めて長期にわたって維持できるとともに、出血の防止抑制効果も得られる。また、糖鎖含有キトサン誘導体に光反応性基を導入しておくことにより、光架橋によって容易にハイドロゲルを形成し、膨隆維持能及び止血能が更に向上する。

**【選択図】** 図 2

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 6 0 1 9 8
受付番号	5 0 3 0 1 7 4 1 9 8 0
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 2 2 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

【提出日】	平成15年10月21日
-------	-------------

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 JP4296NET  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-360198  
【承継人】  
【識別番号】 390033145  
【氏名又は名称】 焼津水産化学工業株式会社  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100109726  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 園田 吉隆  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100101199  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小林 義教  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 058621  
【納付金額】 4,200円

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-360198
受付番号	50401780714
書類名	出願人名義変更届
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成16年11月24日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】 平成16年10月19日

## 【承継人】

【識別番号】 390033145

【住所又は居所】 静岡県焼津市小川新町5-8-13

【氏名又は名称】 焼津水産化学工業株式会社

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100109726

【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿2丁目6番1号 新宿住友ビル43階 園田・小林特許事務所

【氏名又は名称】 園田 吉隆

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100101199

【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿2丁目6番1号 新宿住友ビル43階 園田・小林特許事務所

【氏名又は名称】 小林 義教

特願 2003-360198

出願人履歴情報

識別番号 [596021735]

1. 変更年月日 2000年 5月18日

[変更理由]

住 所

住所変更

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号 KSP 東-50  
2

氏 名

株式会社ネーテック

特願 2 0 0 3 - 3 6 0 1 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 0 0 3 3 1 4 5 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 1 1 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

静岡県焼津市小川新町 5 - 8 - 1 3

氏 名

焼津水産化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**